

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-345956
(43)Date of publication of application : 09.12.2004

(51)Int.CI.

C07K 17/08
// C12N 15/09

(21)Application number : 2003-106825

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL
& TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 10.04.2003

(72)Inventor : IWAKURA MASAHIRO
HIROTA KIYONORI

(54) IMMOBILIZED PROTEIN AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a means for immobilizing protein in high density while controlling orientation.

SOLUTION: The method for producing immobilized protein comprises increasing the content of a primary amino group useful for an immobilization reaction and immobilizing the protein at one part of a carboxy terminal by introducing a polymer compound containing a primary amino group in a repeating structure to a carrier surface.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.11.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's
decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-345956

(P2004-345956A)

(43) 公開日 平成16年12月9日 (2004.12.9)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 17/08
// C12N 15/00

F I

C07K 17/08 ZNA
C12N 15/00 A

テーマコード (参考)

4B024
4H045

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L. (全 15 頁)

(21) 出願番号

特願2003-106825 (P2003-106825)

(22) 出願日

平成15年4月10日 (2003.4.10)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関 1-3-1

(72) 発明者 巖倉 正寛

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法
人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72) 発明者 広田 漢

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法
人産業技術総合研究所つくばセンター内

F ターム (参考) 4B024 AA20 BA80 CA02 CA10 DA06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41
BA42 BA62 FA81

(54) 【発明の名称】 固定化タンパク質及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質を配向制御しながら且つ高密度に固定化する手段を提供する。

【課題解決手段】 一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を担体表面に導入することにより、固定化反応に利用できる一級アミノ基の含量を増大させ、タンパク質をカルボキシ末端の一箇所で高密度に固定化する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(Ⅰ)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質を固定し、固定化タンパク質を製造する方法であって、担体に結合した該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(Ⅰ)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端をペプチド結合により固定化することを特徴とする、固定化タンパク質の製造方法。

【請求項2】

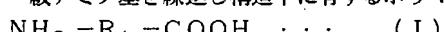
一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物がポリアリルアミンであることを特徴とする請求項1に記載の固定化タンパク質の製造方法。

【請求項3】

一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物がポリリジンであることを特徴とする請求項1に記載の固定化タンパク質の製造方法。

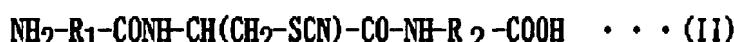
【請求項4】

一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(Ⅰ)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質を固定化し、固定化タンパク質を製造する方法であって、担体に結合させた該ポリマー化合物と、一般式(Ⅱ)

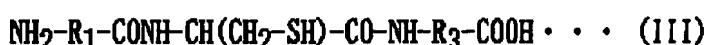


〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を、R₂は中性付近で強く負に荷電しかつ一般式(Ⅱ)の化合物の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質とを反応させることにより、該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(Ⅰ)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端をペプチド結合により結合させることを特徴とする、固定化タンパク質の製造方法。

【請求項5】

一般式(Ⅱ)の化合物が、一般式(Ⅲ)



〔上記式中、R₁、R₂は、上記一般式(Ⅱ)と同じ意味を表す。〕

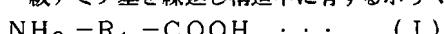
で示される化合物にシアノ化試薬を作用させることにより形成されたものである請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】

一般式(Ⅰ)で示されるタンパク質が、さらにリンカーペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項1～4に記載の固定化タンパク質の製造方法

【請求項7】

一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(Ⅰ)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質を固定した固定化タンパク質であって、担体に結合した該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(Ⅰ)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端がペプチド結合により固定化されていることを特徴とする、固定化タンパク質。

【請求項8】

一般式(Ⅰ)で示されるタンパク質が、さらにリンカーペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項5に記載の固定化タンパク質

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固定化タンパク質および該固定化タンパク質の製造方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

従来、可溶性のタンパク質を、例えばアガロースゲル等の不溶性担体と結合させ、固定化タンパク質として利用することが試みられていた。例えば、酵素タンパク質を不溶性担体に結合した固定化酵素を開発し、それを利用して酵素反応器を作製すること等が行われていた。このような固定化タンパク質の品質としては、タンパク質の性質・機能が均一であること、固定化されていない可溶性タンパク質と同等の性質・機能を保持していること、更に、担体あたりの固定化タンパク質の量が多ければ多いほど良いことが望まれるが、それはタンパク質の固定化方法に依存している。

【0003】

タンパク質固定化の方法としては、タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖の反応性を利用して、不溶性担体と化学的に結合することが主に行われていた。しかし、このような側鎖の官能基を利用する固定化反応を用いる限りにおいては、固定化反応に使用される側鎖を複数有するタンパク質においては、固定化部位を制御すること、複数の箇所での固定化を防ぐこと、更に固定化されたタンパク質の均一性を保つことが困難である。また、これらの困難さの要因は、固定化されたタンパク質の機能低下にもつながるものであり、改善が望まれていた。

【0004】

これらの問題を解消するために、タンパク質の主鎖を介した固定化反応の開発について検討が行われ、既に、本発明者らにより、シアノシスティン残基を介したアミド結合形成反応を利用した、タンパク質のカルボキシ末端のカルボキシル基を、一级アミンを有する担体とペプチド（アミド）結合を介して固定化する方法が開発されている（特許文献1、2参照）。

のことにより、固定化されたタンパク質がカルボキシ末端の一箇所で主鎖を介して結合するため、得られる固定化されたタンパク質は配向制御された形で固定化されており、且つ、完全に均一となる。さらに、配向制御均一性が保たれることで、固定化されたタンパク質の変性の可逆性を高めることができ、固定化タンパク質の熱殺菌を可能にするなどの利用面で優れた特性を付加することができる（特許文献1、2参照）。

【0005】

上記のように、このような優れた性能を有する固定化タンパク質が作製されているが、更に、担体当たりの固定化量を増やすことは、固定化タンパク質の利用面で重要であり、更なる改良が必要であると考えられた。

【特許文献1】特開平10-45798号公報

【特許文献2】特許第3047020号公報

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、上記従来技術の実情に鑑み、担体に固定化したタンパク質が均一に配向しているのみでなく、さらに、担体当たりのタンパク質の固定化量を顕著に増大させる手段を提供することをその課題とするものである。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、タンパク質主鎖のカルボキシ末端の一箇所で配向固定化する場合において、固定化量をさらに増大させるための手段を開発すべく鋭意研究した結果、ポリアリルアミン等の一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を担体表面に導入して、固定化反応に利用できる一級アミノ基の含量を増大させることにより、タンパク質の固定化密度が極めて大で、かつタンパク質をカルボキシ末端の一箇所で配向固定化できるにことを、実験により明らかにし、本発明を完成させた。

【0008】

すなわち、本発明は以下(1)～(8)の構成を伴うものである。

(1) 一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(I)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質を固定し、固定化タンパク質を製造する方法であって、担体に結合した該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(I)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端をペプチド結合により固定化することを特徴とする、固定化タンパク質の製造方法。

(2) 一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物がポリアリルアミンであることを特徴とする上記(1)に記載の固定化タンパク質の製造方法。

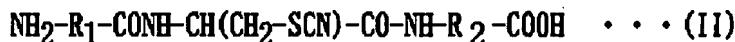
(3) 一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物がポリリジンであることを特徴とする上記(1)に記載の固定化タンパク質の製造方法。

(4) 一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(I)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

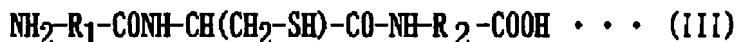
で示されるタンパク質を固定化し、固定化タンパク質を製造する方法であって、担体に結合させた該ポリマー化合物と、一般式(II)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を、R₂は中性付近で強く負に荷電しかつ一般式(II)の化合物の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質とを反応させることにより、該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(I)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端をペプチド結合により結合させることを特徴とする、固定化タンパク質の製造方法。

(5) 一般式(II)の化合物が、一般式(III)

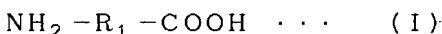


〔上記式中、R₁、R₂は、上記一般式(III)と同じ意味を表す。〕

で示される化合物にシアノ化試薬を作用させることにより形成されたものである上記(4)に記載の製造方法。

(6) 一般式(I)で示されるタンパク質が、さらにリンカーペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項1～4に記載の固定化タンパク質の製造方法

(7) 一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を介して、担体に一般式(I)



〔上記式中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。〕

で示されるタンパク質を固定した固定化タンパク質であって、担体に結合した該ポリマー化合物の一級アミノ基に、一般式(I)で示されるタンパク質主鎖のカルボキシ末端がペプチド結合により固定化されていることを特徴とする、固定化タンパク質。

(8)

一般式(I)で示されるタンパク質が、さらにリンカーペプチドのアミノ酸配列を有する、上記(7)に記載の固定化タンパク質

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、担体表面に一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を結合させ、該ポリマー化合物の一級アミノ基とタンパク質主鎖のカルボキシ末端をペプチド結合させることにより、担体にタンパク質固定化するものである。

本発明においては、固定化させるタンパク質は限定されず、生体内タンパク質、酵素、抗原タンパク質、抗体等あらゆるタンパク質を固定化することが可能である。したがって、

本発明は、例えば、酵素を固定化させて酵素反応器を作製すること、固定化したタンパク質が有する他の化合物に対する親和性等の特異的分子間相互作用を利用した分離用担体を作製すること、あるいは、更に、特定の抗原または抗体を固定化させて抗原抗体反応を利用した診断用抗原または抗体を固定化した担体を作製すること等の極めて広い用途に適用が可能である。

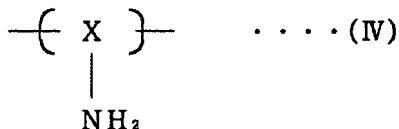
【0010】

1. 固定化に供される担体及びポリマー化合物

本発明においては、一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を不溶性担体表面に結合することにより、固定化反応に利用できる一級アミンの含量が増大した担体を用いることに特徴を有する。本発明における担体と上記ポリマー化合物との結合手段は、上記ポリマー化合物を安定的に担体表面に保持しうるものであればいずれでもよく、例えば、イオン結合、共有結合、疎水結合あるいは吸着、接着、被覆等の化学、物理的結合手段が挙げられる。

一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物としては、主鎖としてポリアルキレン鎖を有するもの、ポリアミド鎖を有するもの、ポリエステル鎖を有するものポリスチレン鎖を有するもの等が挙げられ、一般式 (IV) で表される繰り返し構造を有する。

【化1】



〔上記式 (IV) 中、Xは、例えば、ポリアルキレン鎖、ポリアミド鎖、ポリエステル鎖、ポリスチレン鎖等を構成するモノマー残基を表す。また、NH₂基は、該モノマー残基中に含まれる基であってもよいし、これらポリマー化合物の主鎖から分枝した側鎖中に含まれる基であってもよい。〕

【0011】

本発明においては、これらのポリマー化合物のうち、ポリアルキレン鎖を有するものとして、例えば、ポリアリルアミンを挙げることができるが、このポリマー化合物は単位質量当たりの一級アミン含量が高く、本発明において好ましいものとして用いることができる。しかし、本発明はこれに限定されず、例えば、一級アミノ基を側鎖に有するビニル化合物と他のビニル化合物との共重合体、あるいはポリリジンなど各種のポリマー化合物が利用できる。

一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を表面に導入した担体としては、ポリアリルアミンをグラフトしたセルロファインが知られている（参考論文：Ung-Ji n Kim, Shigenori Kuga, Journal of Chromatography A, 946, 283-289 (2002) 参照）が、これに類する担体は、一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を、担体に結合することにより容易に作製することができる。このような担体としては、例えば、CNBr活性化セファロースFF、NHS活性化セファロースFF等の化学的に一級アミノ基と反応性を有する担体が知られており、これにポリアリルアミンなどの一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を作用させることにより、ポリマー化合物が担体に共有結合により結合した担体を作製できる。

【0012】

この作成においては、一級アミンを繰り返し有するポリマー化合物と活性化担体との混合比を適度に調製することにより、作製されるポリマー化合物結合担体において、タンパク質の固定化反応に利用できる一級アミノ基の含量を変化させることができる。

【0013】

2. 固定化に供されるタンパク質

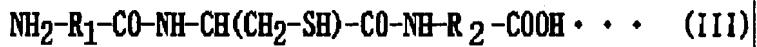
本発明においては、一般式 (I)



(式1中、R₁は任意のアミノ酸配列を表す。)

で示されるタンパク質の固定化において、まず、

一般式 (III)



〔式 (III) 中、R₁ は任意のアミノ酸配列、R₂ は、中性付近で強く負に荷電し、且つ上記一般式 (III) の物質の等電点を酸性にできる任意のアミノ酸残基の連鎖を表す。〕で示される配列のタンパク質を合成する。

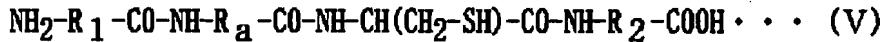
【0014】

この一般式 (III) で表されるタンパク質の構造中、アミノ酸配列 R₂ は中性付近で強く負に荷電しており、中性条件では正に帯電する上記一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物と静電相互作用が生じる。

したがって、一般式 (III) で表されるタンパク質は、そのカルボキシル末端側が、担体上のポリマー化合物の一級アミノ基側に吸着されることにより、以下に説明するペプチド (アミド) 結合生成反応により、タンパク質主鎖のカルボキシル末端を該一級アミノ基と効率よく結合させることができることができ (特願2002-148950、特許第3047020号公報参照)。

【0015】

さらに、本発明においては、上記一般式 (III) R₁ のカルボキシ末端側にリンカーペプチドとなるアミノ酸配列を含んでいてもよい。この場合のタンパク質は以下の一般式 (V) で表される。



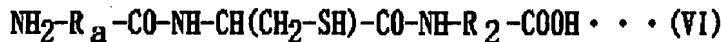
(式中、R₁ 及び R₂ は、前記一般式 (III) の R₁ 及び R₂ とそれ同一であり、R_a は、固定化しようとするタンパク質と上記ポリマー化合物結合担体との間のリンカーペプチドとなるアミノ酸配列を表す。) R_a は任意でありそのアミノ酸の種類、数ともに限られないが、例えば G1y-G1y-G1y-G1y-G1y-G1y 等が最も単純な配列の一つである。

本発明において、このようなタンパク質は、遺伝子工学的に公知の技術により容易に作製することができる。

【0016】

例えば、上記一般式 (V) で示される融合タンパク質をコードする遺伝子DNAを調製する場合には、

一般式 (1) で表されるタンパク質をコードする遺伝子DNAと 一般式 (VI)



(式中、R_a は上記一般式 (V) の R_a とそれ同一であり、R₂ は、中性付近で強く負に荷電し、且つ上記一般式 (III) の物質の等電点を酸性にできる任意のアミノ酸残基の連鎖を表す。)

で示されるペプチド配列をコードする遺伝子DNAとを結合することにより、上記一般式 (V) で示される融合タンパク質をコードする遺伝子DNAを合成し、合成したDNAを適切な発現ベクターに組み込み、これを大腸菌などの宿主に形質導入し、形質転換した宿主において発現させ、その後、発現したタンパク質を分離精製することにより得ることができる。

【0017】

あるいは、上記タンパク質は、遺伝子工学的手法と慣用のタンパク質合成技術との組み合せ、または、蛋白合成技術のみによっても作製することができる。

一方、上記一般式 (III) および (V) における R₂ としては、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列が好適である。好ましくは、下記一般式 (II) あるいは (VI)

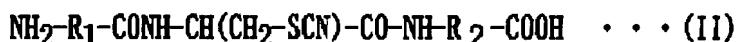
I) で表されるシアノ化タンパク質の等電点を4~5の間の値になるように、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列をデザインすればよい。そのような配列のうち好適な列としてアラニル-ポリアスパラギン酸をあげることができる。その理由は、シアノシステイン残基の次のアミノ酸残基をアラニンにすることにより、シアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応が生じやすうことと、アミノ酸側鎖の中でアスパラギン酸のカルボキシル基が最も酸性であるからである。

【0018】

3. タンパク質の固定化

本発明において調製される固定化タンパク質は、不溶性担体に結合した、一级アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物の一級アミノ基とタンパク質の主鎖のカルボキシ末端のカルボキシル基とがペプチド(アミド)結合で結合した構造を有する。

この結合を達成させるためには、上記一般式(I I I)あるいは一般式(V)のタンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステインに変換する必要があり、一般式(I I I)のシアノ化により得られるシアノ化タンパク質は以下の一般式(I I)で表されるタンパク質である。



[上記式中、R₁、R₂は一般式(I I I)のR₁、R₂とそれと同じであり、R₁は任意のアミノ酸配列を、R₂は中性付近で強く負に荷電しかつ一般式(I I)の化合物の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。]

【0019】

また、一般式(V)のシアノ化により得られるシアノ化タンパク質は以下の一般式(V I I)で表されるタンパク質である。



[式中、R₁、R₂はR_aは、前記一般式(V)のR₁、R₂及びR_aとそれぞれ同一であり、R₁は任意のアミノ酸配列を、R₂は中性付近で強く負に荷電しかつ一般式(I I)の化合物の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。また、R_aは、固定化しようとするタンパク質と上記ポリマー化合物結合担体との間のリンカーペプチドとなるアミノ酸配列を表す。]

【0020】

このシアノ化反応は、市販のシアノ化試薬を用いて行うことができる。シアノ化試薬としては、通常、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(2-nitro-5-thiocyano benzoic acid (NTCB)) (Y. Degani, A. Ptchornik, Biochemistry, 13, 1-11 (1974) 参照) または、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロ硼酸(1-cyano-4 dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP))などを用いる方法が簡便である。

NTCBを用いたシアノ化は、pH 7.0の10 mM硼酸緩衝液中で効率よく行うことができる。このシアノ化反応の後、溶媒を弱アルカリにすることにより、固定化反応が進行する。即ち、シアノシステイン残基直前のアミノ酸残基のカルボキシル基と担体の一級アミノ基との間にアミド結合が形成される。このことは、緩衝液をpH 9.5の10 mM硼酸緩衝液に換えること等で可能である。

【0021】

上記固定化反応に必要なシステイン残基のスルフヒドリル基のシアノシステインの変換は、既に本発明者らが明らかにしているように、タンパク質を固定化する担体に吸着させる前でも、後でも、あるいは吸着と同時にあってよい(特願2002-148950 参照)。

一般式(I I)及び(V I I)で表されるシアノ化後のタンパク質も中性付近で強く負に帶電するアミノ酸配列を有しているため、シアノ化後のタンパク質を担体を吸着させても

タンパク質主鎖のカルボキシ末端側が担体上のポリマー化合物の一級アミノ基側に配向し、上記アミド形成反応により、タンパク質主鎖のカルボキシ末端側が該一級アミノ基と結合する。

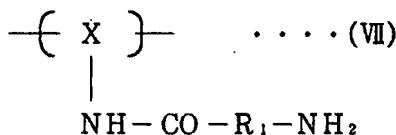
【0022】

本発明で用いるシアノシスティンが関与する反応には、副反応として加水分解反応が起こりうるが、このような副反応から生成する反応物は全て溶媒に溶けるため、反応後、固定化担体を適当な溶媒で洗うことにより副反応生成物を取り除くことができる。

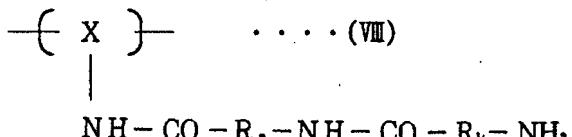
以上の手段により得られる本発明の固定化酵素は、一般式(VIII)あるいは(VIII')で表される繰り返し構造部分を有し、タンパク質のカルボキシ末端一箇所で担体上のポリマー化合物と結合し、該ポリマー化合物は、イオン結合、共有結合、疎水結合あるいは吸着、接着、被覆等の化学的あるいは物理的結合手段等により不溶性担体に結合しているものである。

【0023】

【化2】



【化3】



(上記式VIII、IX中、R₁ およびR_a は一般式(I)のR₁ 及び一般式(V)のR_a とそれ同一であり、Xは、一般式(IV)のXと同一である。)

【0024】

本発明に従うと、本発明者らが既に発明している従来の方法(特願2002-148950、特許第3047020号公報参照)に比較して2倍以上の高密度でタンパク質を配向制御固定化することができる。

【0025】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

本実施例において用いる不溶性担体としては、一般式(1)に該当する一級アミノ基を有するポリマーとして、日東紡で市販しているL型ポリアリルアミンを市販されている不溶性担体であるCNBr活性化セファロース(ファルマシアより購入)に作用させることにより結合させたもの(これをポリアリルアミン結合セファロースと称する)である。

本実施例において固定化に用いるために調整されたタンパク質は、それぞれ緑色蛍光タンパク質(配列番号1)に、リンカーペプチド部分のアミノ酸配列(G1y-G1y-G1y-G1y-G1y-G1y)、システイン(Cys)及び中性付近で強く負に帯電し、かつ得られるタンパク質の等電点を酸性にするためのアミノ酸配列(A1a-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp)を順次付加したタンパク質(配列番号2)であり、固定化されるタンパク質は、緑色蛍光タンパク質にリンカーペプチドが付加されたタンパク質である。なお、本発明において固定化されるタンパク質が、タンパク質の種類に依存しないことは、既に明らかにされている(特願2002-148950、特許第3047020号公報参照)。

【0026】

【実施例1】

[ポリアリルアミン結合セファロースの作製]

5 gのCNBr活性化セファロースを、20 mlの1 mMの塩酸に懸濁し、30分間攪拌後、50 mlの1 mMの塩酸で洗浄した。不溶性部分を集め、20 mlの0.1% L型ポリアリルアミン溶液に懸濁し、緩やかに12時間混合し、結合反応を行わせた。その後、不溶性部分を20 mlの1 Mのモノエタノールアミン溶液に懸濁し、4時間、室温で穏やかに攪拌することにより、未反応の担体上の活性基をマスクした。さらに、20 mlの1 M NaClを含む50 mMグリシン/HCl緩衝液(pH 3.5)での洗浄と20 mlの1 M NaClを含む50 mMトリス/HCl緩衝液(pH 8.0)での洗浄を交互に8回行い、得られた不溶性部分を集め、以降のタンパク質の固定化に用いた。

【0027】

このようにして得られたポリアリルアミン結合セファロースの導入された一級アミンの含量をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS; 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)を用いた着色反応(参考文献: Robert Fields, Methods in Enzymology, 25, p464-468 (1971))で調べたところ、一級アミンを含む担体として市販されているアミノーセルロファイン(生化学工業で販売)、AF-アミノトヨパール(TOSOHで販売)、EAH-セファローズ4B及びリジンーセファローズ4B(アマシャムファルマシアで販売)、アフィゲル102(バイオラッドで販売)、ボラス20NH(ベーリングガーマンハイムで販売)と比較して明らかに強い着色反応を示し、高い一級アミン含量をしめした。

【0028】

〔タンパク質の調製〕

緑色蛍光タンパク質(配列番号1)のカルボキシ末端側の8個のアミノ酸配列とGly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Aspで示されるアミノ酸配列とを結合したアミノ酸配列をコードするDNA配列を化学合成し、これと、緑色蛍光タンパク質のアミノ末端側の8個のアミノ酸配列部をコードするDNA配列を化学合成したものを、それぞれをプライマ-DNAとしてPCR反応を行うことで、リンカーペプチドが付加された固定化用緑色蛍光タンパク質(配列番号2)に対応するアミノ酸配列をコードする遺伝子DNAを調製し、発現ベクター-pUC18のEcoRIとHindIII部位に組み込み、組み換えプラスミドを調製した。これを大腸菌株JM109株に導入し、発現させた後、以下に述べる様にして分離精製した。

【0029】

なお、緑色蛍光タンパク質(配列番号1)をコードする遺伝子は、QUANTUM社より市販されているものを購入し用いたが、遺伝子の入手方法により本発明は限定されない。上記固定化用緑色蛍光タンパク質を発現する組み換え大腸菌を、2リッターの培地(20 gの塩化ナトリウム、20 gの酵母エキス、32 gのトリプトン、100 mgのアンビシリソナトリウムを含んでいる)で、37℃で一晩培養した後、培養液を20分間低速遠心(毎分5000回転)することにより、湿重量約5 gの菌体を得た。これを、40 mlの1 mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む10 mM磷酸緩衝液(pH 7.0)

(緩衝液1)に懸濁し、フレンチプレスに菌体を破碎した後、20分間遠心分離し(毎分20,000回転)、上清を分離した。得られた上清に、最終濃度が2%になるようにストレプトマイシン硫酸を加え、4℃で20分間攪拌後、20分間遠心分離し(毎分20,000回転)、上清を分離した。得られた上清に、最終濃度が40%になるよう硫酸アンモニウムを加え、4℃で20分間攪拌後、20分間遠心分離し(毎分20,000回転)、上清を分離した。得られた上清に、最終濃度が90%になるよう硫酸アンモニウムを加え、4℃で30分間攪拌後、20分間遠心分離し(毎分20,000回転)、沈殿を分離した。沈殿を40 mlの緩衝液1に溶解し、4 lの緩衝液1に対して、3回透析した。

【0030】

透析したタンパク質溶液を、あらかじめ50 mMのKClを含む緩衝液1で平衡化したDEAEトヨパール(東ソー株式会社より購入)のカラム(200 ml)にアプライし、500 mlの50 mMのKClを含む緩衝液1を流した後、緩衝液1を用いて、50 ml

Mから500mMのKC1濃度勾配をかけることにより、タンパク質を溶出させ、上記固定化用緑色蛍光タンパク質を含む画分を分離した。分離した画分を、緩衝液1に対して透析した後、あらかじめ50mMのKC1を含む緩衝液1で平衡化したSuperQトヨパール（東ソー株式会社より購入）のカラム（200ml）にアプライし、500mlの50mMのKC1を含む緩衝液1を流した後、緩衝液1を用いて、50mMから500mMのKC1濃度勾配をかけることにより、タンパク質を溶出させ、上記固定化用緑色蛍光タンパク質を含む画分を分離した。この段階で、タンパク質は均一化でき、約100mgの均一な、上記固定化用緑色蛍光タンパク質が得られた。

【0031】

得られたタンパク質を、緩衝液1に対して保存し、透析済みサンプルを4°Cで保存し、以後の実験に用いた。上記固定化用緑色蛍光タンパク質の濃度は、配列番号1で示される緑色蛍光タンパク質の分子吸光係数=22,000を用いて、280nmの吸光度より決定した。

【0032】

〔タンパク質の固定化〕

上記工程で得た上記固定化用緑色蛍光タンパク質（配列番号2）を、あらかじめ1000倍量の5mMのエチレンジアミン4酢酸（EDTA）を含む10mM硼酸緩衝液（pH7.0）（緩衝液2）に対して3回以上透析を行った。透析済みタンパク質を、緩衝液2で希釈することにより、各種濃度の上記固定化用緑色蛍光タンパク質溶液を調製した。

10μlのポリアリルアミン結合セファロースと990μlの上記固定化用緑色蛍光タンパク質を混合し、2時間以上室温で穏やかに攪拌混合した後、1000回転で数秒間遠心し、不溶性部分を集めた。ほとんどすべての蛍光物が不溶性部分（すなわち、ポリアリルアミン結合セファロース）に移行し、上記固定化用緑色蛍光タンパク質がポリアリルアミン結合セファロースに吸着することが明らかとなった（この段階のサンプルを、吸着サンプルという。）

【0033】

着色した不溶性部分を、5mMの2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸（NTCB）を含む緩衝液2に懸濁し、穏やかに攪拌混合しながら室温で4時間シアノ化反応を行わせた。その後、1mlの緩衝液2で5回洗浄した。得られた不溶性部分を1mlの、5mMのEDTAを含む10mM硼酸緩衝液（pH9.5）に懸濁し、穏やかに攪拌混合しながら室温で24時間固定化反応を行った。不溶性部分を、1mlの1MKCLを含む10mM硼酸緩衝液（pH7.0）で5回洗浄し、未反応物及び固定化反応の副反応生成物を除去した。

ポリアリルアミン結合セファロースに固定化した緑色蛍光タンパク質の固定化量は、可視部での蛍光を測定することにより求めた。

【0034】

分光蛍光度計（FP-750；JASCO）を用いて、上記固定化反応で得られた不溶性部分を3mlの緩衝液2で懸濁し485nm～600nmまでの蛍光スペクトルを25°Cで測定した。参照実験として、10μlのポリアリルアミン結合セファロースに10nmolesの上記固定化用緑色蛍光タンパク質を吸着させて得られる不溶性部分を3mlの緩衝液2で懸濁した蛍光スペクトルを25°Cで測定した（参照スペクトル）。いずれの蛍光スペクトルも511nmに最大蛍光強度を示した。蛍光の測定を全く同一で行うことにより511nmの蛍光強度を用いて、固定化された緑色蛍光タンパク質の質量を求めた。

また、比較のために、他の担体としてアミノセルロファイン、アミノトヨパール、アミノセファロースを用い、同様な実験を行った。

【0035】

得られた結果を図1に示した。図1は、担体1mlを用いたとした場合の、固定化反応に用いたタンパク質量（投入タンパク質量）と固定化されたタンパク質量との関係を示す図である。図中、●は本発明のポリアリルアミン結合セファロース、○はアミノセファロー

ス(市販)、▲はアミノセルロファイン(市販)、△はアミノトヨパール(市販)を示す。図で示されるように、担体1mL当たりの最大固定化量は、アミノトヨパールで約0.3μmol/L、アミノセルロファイン及びアミノセファロースでは約0.4μmol/Lであり、本発明のポリアリルアミン結合セファロースが示す最大固定化量約1μmol/Lであり、従来の担体を用いる場合の2から3倍のタンパク質を固定化できる。また、本発明に用いられるシアノシスティンを介した固定化方法は、タンパク質を配向制御しながら固定化する方法でもある。このように、一級アミノ基を繰返し構造中に有するポリマー化合物を不溶性担体として利用すること有利性が明らかである。従って、本発明が目指す、配向制御しながら且つ高密度なタンパク質が達成されたものと考えられる。

【0036】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、従来法に比べ、タンパク質を配向制御しながら極めて高密度で担体に固定化することができる。また、一級アミノ基を有するポリマー化合物を導入するために利用できる不溶性担体としては、特に制限が無く、一級アミノ基を有するポリマー化合物に対する化学結合形成能力を創成できるものであればどのようなものでもよく、固定化されるタンパク質に制限は全くない。

したがって、本発明は、酵素利用分野、抗原抗体、生体内生理活性物質、酵素等を使用して診断等を行う医療分野、あるいはこれら物質の特異的親和性を利用した分離精製分野等、極めて幅広い分野に適用できる有用な手段を提供するものである。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
〈120〉 A method for immobilizing a protein and immobilized protein
〈130〉 341-02770
〈140〉
〈141〉
〈160〉 11
〈170〉 PatentIn Ver. 2.1
〈210〉 1
〈211〉 239
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

〈400〉 1

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80
Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn
 225 230 235

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 253

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Artificial
sequence

⟨400⟩ 2

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

245 250

【図面の簡単な説明】

【図1】各種担体に緑色蛍光蛋白質を固定化させた場合における、投入タンパク質と固定化されたタンパク質との関係を示す図である。

【図1】

